



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

①2 **Offenlegungsschrift**  
①0 **DE 100 25 464 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**A 61 K 38/55**

②1 Aktenzeichen: 100 25 464.0  
②2 Anmeldetag: 23. 5. 2000  
④3 Offenlegungstag: 6. 12. 2001

DE 100 25 464 A 1

<p>⑦1 Anmelder: Institut für Medizintechnologie Magdeburg GmbH, 39120 Magdeburg, DE</p> <p>⑦4 Vertreter: Koepe und Kollegen, 81245 München</p>	<p>⑦2 Erfinder: Neubert, Klaus, Prof. Dr., 06128 Halle, DE; Lendeckel, Uwe, Dr., 39128 Magdeburg, DE; Ansorge, Siegfried, Prof. Dr., 39291 Hohenwarthe, DE; Bühling, Frank, Dr., 39108 Magdeburg, DE; Reinhold, Dirk, Dr., 39108 Magdeburg, DE; Arndt, Marco, Dr., 06217 Merseburg, DE</p> <p>⑤6 Entgegenhaltungen: Medline Abstr. 94063986; Medline Abstr. 97079253; Medline Abstr. 1999441169; EMBASE Abstr. 95265560; Medline Abstr. 1998014485; Lifesci Abstr. 95:105350; Brosis Abstr. 1991:223563;</p>
--	--

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Kombinierte Verwendung von Enzyminhibitoren zur Therapie von Autoimmunerkrankungen, bei Transplantationen und Tumorerkrankungen sowie Kombinationen von Enzyminhibitoren umfassende pharmazeutische Zubereitungen

⑤7 Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren, bei dem durch die gleichzeitige und gemeinsame Hemmung von Enzymaktivitäten der (I) Alanyl-Amino-peptidase und Dipeptidyl-peptidase IV, (II) der Dipeptidyl-peptidase IV und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, (III) der Dipeptidyl-peptidase IV und Prolyloligo-peptidase sowie (IV) der Dipeptidyl-peptidase IV und der X-Pro-Amino-peptidase die DNS-Synthese und damit die Proliferation von mononukleären Zellen (MNZ) als auch von T-Zellen in einem Ausmaß hemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren - auch bei höherer Dosierung - nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich den gleichen Prozess, nämlich die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren nicht vollständig und nicht dauerhaft. Aus der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine additive/superadditive Hemmwirkung auf DNS-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung mehrerer der genannten Enzyme.

Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie von Autoimmun- und chronischen Erkrankungen mit entzündlicher Genese sowie zur Behandlung von Abstoßungsepisoden nach Transplantation die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der oben genannten Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

DE 100 25 464 A 1

- [0001] Die Erfindung beschreibt die kombinierte Hemmung von Enzymaktivitäten der Aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2, CD13), der Dipeptidylpeptidase N (DP IV, EC 3.4.14.5, CD26), der Prolyloloigopeptidase (POP, Prolylendopeptidase, PEP, EC 3.4.21.26), der membranständigen Aminopeptidase P (X-Pro-Aminopeptidase, APP, XPNPEP2, EC 3.4.11.9) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, (angiotensin-converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1, CD156) durch die simultane Applikation von jeweils spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten, durch welche die Aktivierung, die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen supprimiert wird.
- 10 [0002] Für alle Erkrankungen mit Autoimmunpathogenese gilt, dass eine Aktivierung und Proliferation von Immunzellen, insbesondere von autoreaktiven T-Zellen, dem Krankheitsprozess zugrunde liegen bzw. diesen ausmachen. Die gleichen Mechanismen kommen bei akuten bzw. chronischen Abstoßungsepisoden nach Organtransplantation zur Wirkung.
- 15 [0003] Es ist gezeigt worden, dass im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26 a surface protease involved in T-cell activation. Immunology Today 1994; 15: 180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. International Journal of Molecular Medicine 1999; 4: 17-27; Riemann D et al.: CD13 - not just a marker in leukemia typing. Immunology Today 1999; 20: 83-88]. Verschiedene Funktionen mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder angereicherter T-Lymphozyten wie DNS-Synthese, Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV und der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. Biomed. Biochim. Acta 1985; 2: K9-K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. Eur. J. Immunol. 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta$ 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360; Lendeckel U et al.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. Biochem. J. 1996; 319: 817-823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). Int. J. Mol. Med. 1999; 4: 3-15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). Int. J. Mol. Med. 1999; 4: 17-27].
- 20 [0004] Es ist bereits bekannt, dass die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen durch die Hemmung der auf Immunzellen lokalisierten Dipeptidylpeptidase IV mittels synthetischer Inhibitoren teilweise möglich ist (z. B. EP 764151 A1, WO 09529691, EP 731789 A1, EP 528858). Für die Enzyme Aminopeptidase N, "angiotensin-converting enzyme", X-Pro-Aminopeptidase und Prolyloloigopeptidase sind solche Effekte bisher nicht bekannt.
- 25 [0005] Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, dass die Gleichzeitige Hemmung der enzymatischen Aktivitäten von (I) Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N, (II) der Dipeptidylpeptidase IV und des "angiotensin-converting enzyme", (III) der Dipeptidylpeptidase IV und der Prolyloloigopeptidase sowie (IV) der Dipeptidylpeptidase IV und der X-Pro-Aminopeptidase die DNS-Synthese und damit die Proliferation von mononukleären Zellen (MNZ) als auch von T-Zellen in einem Ausmaß hemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren - auch bei höherer Dosierung - nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich den gleichen Prozess, nämlich die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren wesentlich schwächer ausgeprägt und nicht dauerhaft. Wegen der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten der genannten Enzyme resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine superadditive Hemmwirkung auf DNS-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung von zwei oder mehreren dieser Enzyme.
- 30 [0006] Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie von Autoimmun- und entzündlichen Erkrankungen sowie zur Behandlung von Abstoßungsepisoden nach Transplantation die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der oben genannten Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.
- 35 [0007] Im einzelnen liegen der Erfindung die Befunde zugrunde, dass die DNS-Synthese von MNZ und T-Zellen durch die simultane Administration von Inhibitoren der enzymatischen Aktivität von
- I. Dipeptidylpeptidase IV und Aminopeptidase N,
  - II. Dipeptidylpeptidase IV und Angiotensin-konvertierendem Enzym,
  - III. Dipeptidylpeptidase IV und Prolyloloigopeptidase
  - IV. Dipeptidylpeptidase IV und X-Pro-Aminopeptidase in superadditiver Weise inhibiert wird.

[0008] Die Applikation von Enzyminhibitoren stellt bei den genannten Erkrankungen eine neuartige Methode und ergänzende Therapieform dar.

- 40 [0009] Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV, der Aminopeptidase N, der Prolyloloigopeptidase, des "angiotensin-converting enzyme" und der X-Pro-Aminopeptidase können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptidderivate sowie als Antikörper dieses Enzyms zur Anwendung kommen. Bevorzugte Effektoren sind beispielsweise für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)n-Peptide (n = 0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäureamide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein  $\alpha$ -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N $^{\epsilon}$ -4-Nitrobenzylloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate. Derartige

Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD 296 075 A5).  
 [0010] Die Inhibitoren werden simultan mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instilativer Applikation und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

#### Ausführungsbeispiele

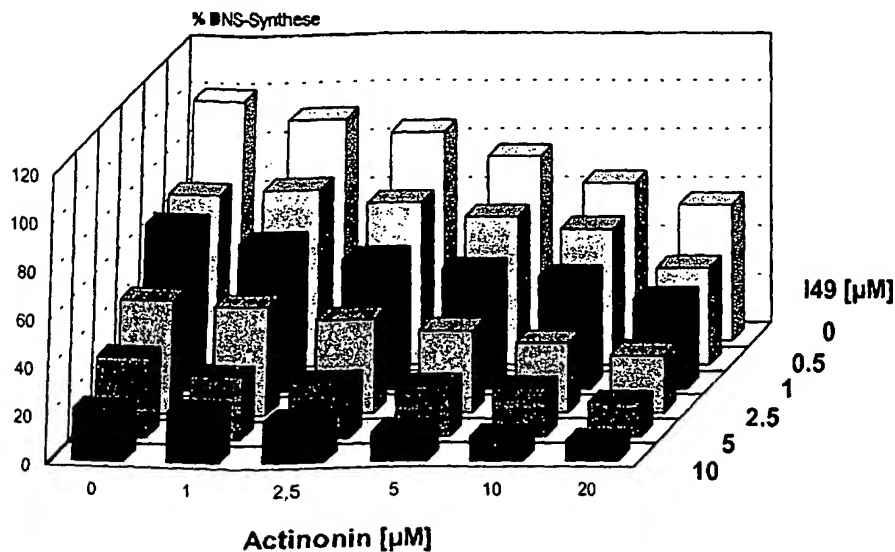
##### Beispiel 1

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN

[0011] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und APN (Actinonin) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 1 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

Abb. 1

[0012] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Aminopeptidase N (Actinonin) auf die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten. Humane periphere T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium <sup>3</sup>[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an <sup>3</sup>[H]-Thymidin gemessen.



##### Beispiel 2

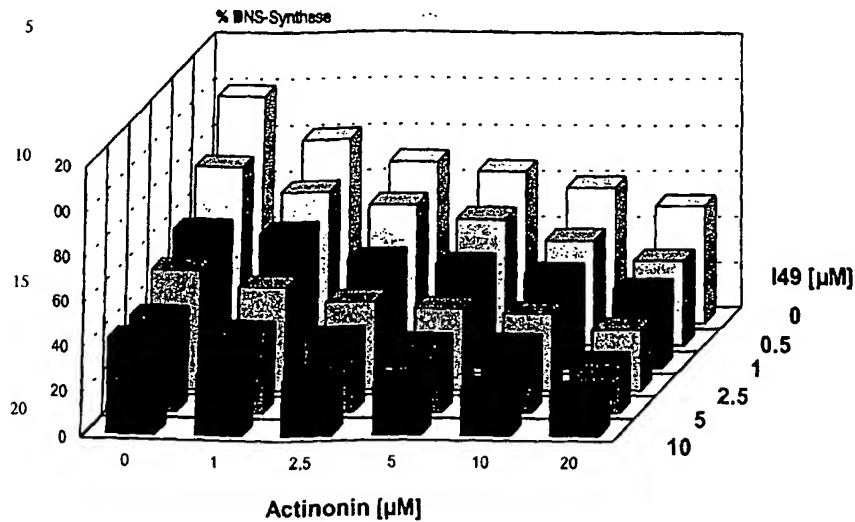
Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN

[0013] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und APN (Actinonin) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 2 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

Abb. 2

[0014] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der APN (Actinonin) auf die

DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium  $^3\text{H}$ -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen.



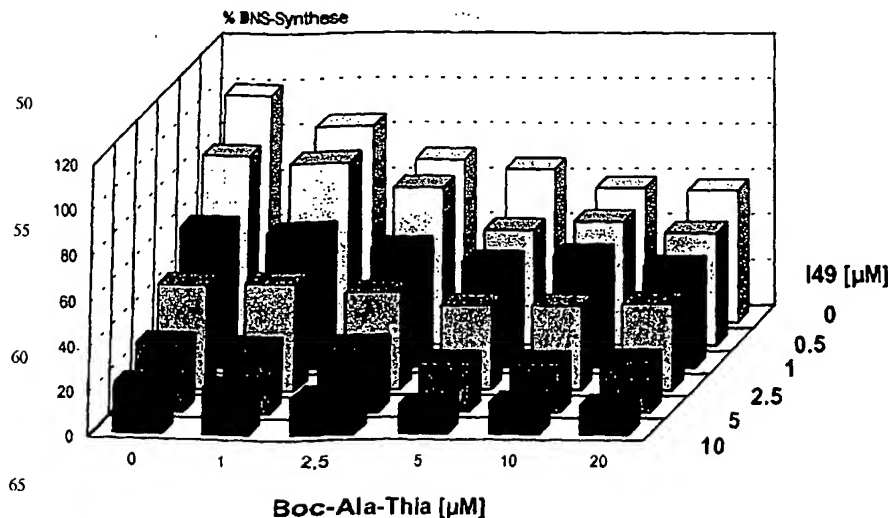
Beispiel 3

Inhibition der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der POP

[0015] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und der Prolylilopeptidase (Boc-Ala-Thiazolidid) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor  $\beta 1$  in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 3 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

Abb. 3

[0016] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Prolylilopeptidase (Boc-Ala-Thia) auf die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten. Humane T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium  $^3\text{H}$ -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen.



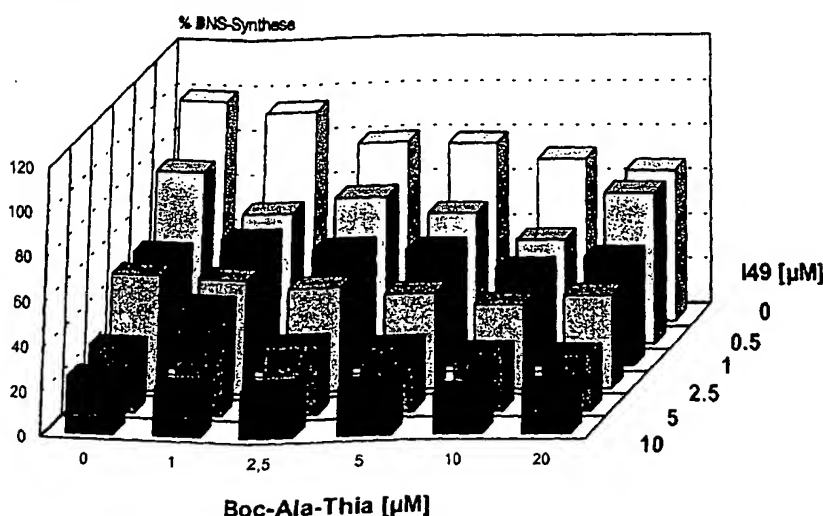
## Beispiel 4

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der POP

[0017] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und der Prolylilopeptidase (Boc-Ala-Thiazolidid) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abb. 4 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

Abb. 4

[0018] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Prolylilopeptidase (Boc-Ala-Thia) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium <sup>3</sup>[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an <sup>3</sup>[H]-Thymidin gemessen.



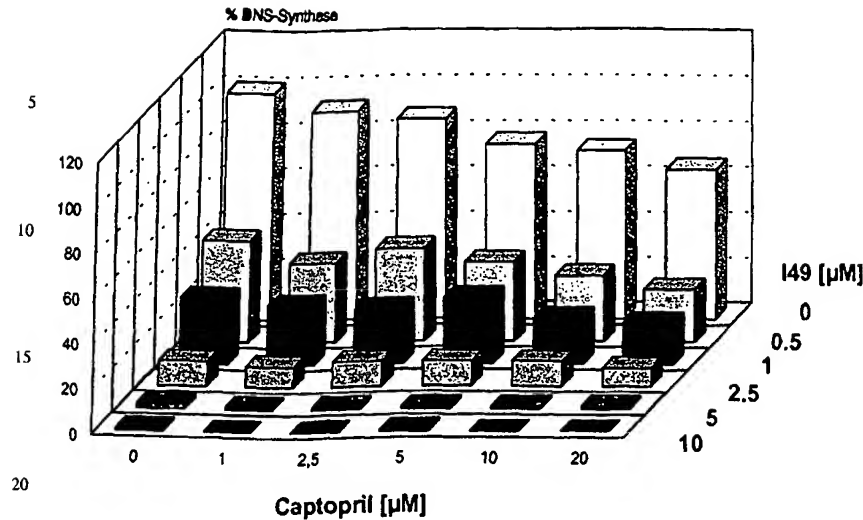
## Beispiel 5

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und des ACE

[0019] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abb. 5 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

Abb. 5

[0020] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) auf die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten. Humane T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium <sup>3</sup>[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an <sup>3</sup>[H]-Thymidin gemessen.



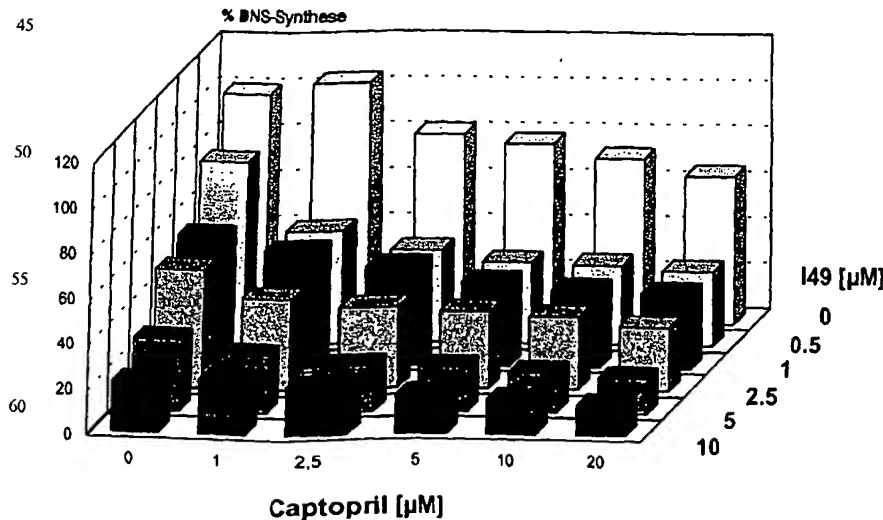
Beispiel 6

Inhibition der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und des ACE

[0021] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid = I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abb. 6 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

Abb. 6

[0022] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium <sup>3</sup>[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an <sup>3</sup>[H]-Thymidin gemessen.

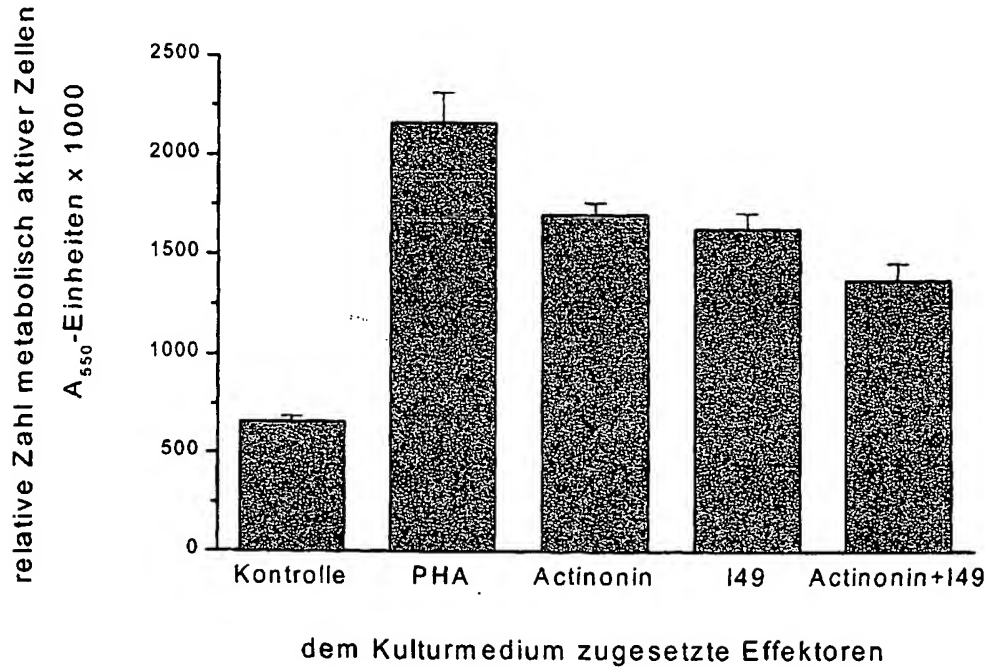


## Beispiel 7

Hemmung der Proliferation von humanen peripheren mononukleären Zellen (MNZ) durch die einzelne und gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid) und APN (Actinonin)

Abb. 7

[0023] Die MNZ wurden über einen Zeitraum von 72 h ohne Zusatz (Kontrolle), mit dem mitogenen Lektin Phytohämagglutinin (PHA) bzw. mit PHA und den angegebenen Inhibitoren inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

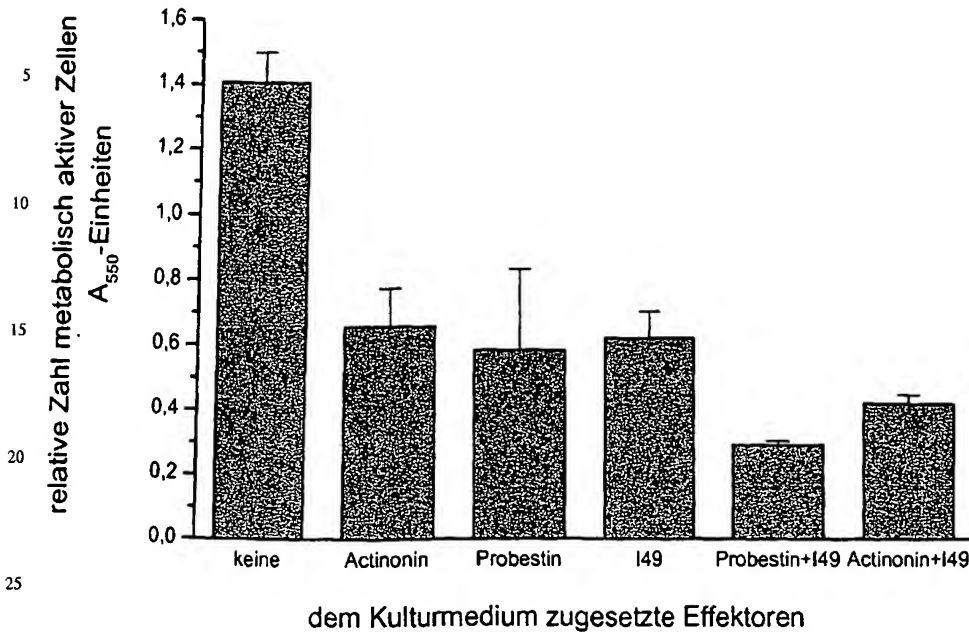


## Beispiel 8

Hemmung der Proliferation der humanen T-Zelllinie KARPAS-299 durch die einzelne und gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid) und APN (Actinonin und Probestin)

Abb. 8

[0024] Die KARPAS-299-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h ohne Zusatz (Kontrolle) bzw. in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

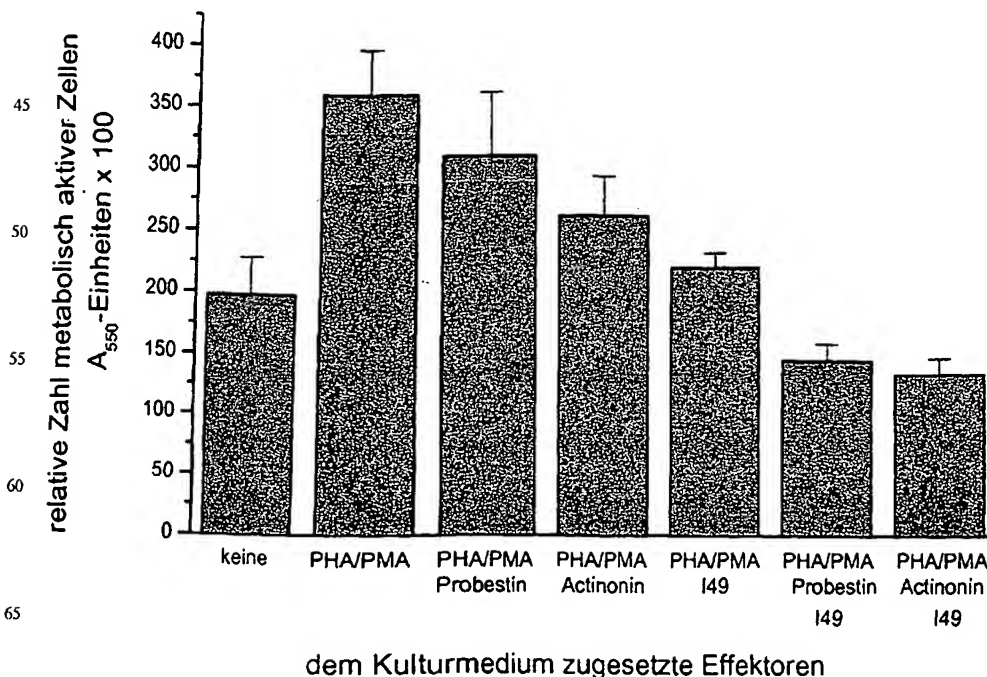


Beispiel 9

Hemmung der Proliferation aktivierter, humaner peripherer T-Zellen durch die einzelne bzw. gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid) und APN (Actinonin und Probestin)

Abb. 9

[0025] Die T-Zellen wurden mit Ausnahme der unbehandelten Kontrolle durch Zugabe zum Kulturmedium von Phytohämagglutinin und Phorbol-12-myristat-13-acetat aktiviert und über einen Zeitraum von 72 h in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.





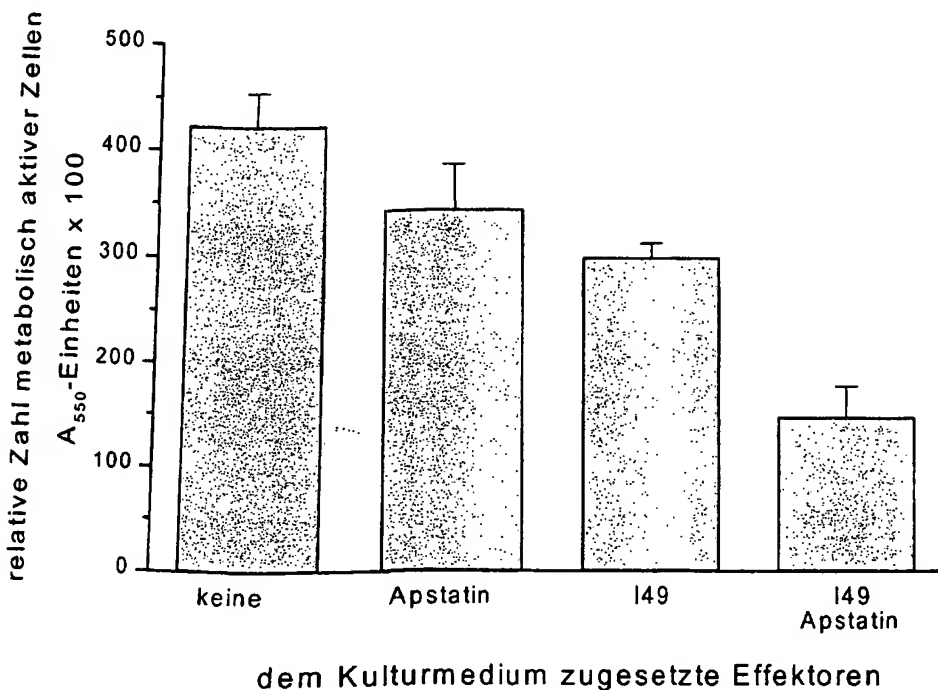
Hemmung der Proliferation PHA-aktivierter, humaner mononukleärer Zellen (MNZ) durch die einzelne bzw. gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO<sub>2</sub>)]-thiazolidid) und der X-Pro-Aminopeptidase (APP) (Apstatin)

5

Abb. 10

[0026] Die mononukleären Zellen (MNZ) wurden über einen Zeitraum von 72 h in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

10



15

20

25

30

35

#### Patentansprüche

40

1. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität), der X-Pro-Aminopeptidase (Aminopeptidase P, APP), des "angiotensin-converting enzyme" (ACE) und/oder der Prolyl oligopeptidase (POP, Prolyl oligopeptidase, PEP) zur superadditiven Hemmung von Aktivierung, DNS-Synthese und Proliferation humaner T-Lymphozyten bzw. mononukleärer Zellen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z. B. Proboro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)<sub>n</sub>-Peptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure, n = 0–10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze sind, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure bzw. ein seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isolucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.
3. Verwendung nach Anspruch 1, worin Aminosäureamide, z. B. N<sup>ε</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat bevorzugt als DP IV-Inhibitoren eingesetzt werden.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei als Inhibitoren der APN bevorzugt Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amapstatin, Probestin,  $\beta$ -Aminothiolo,  $\alpha$ -Aminophosphinsäuren,  $\alpha$ -Aminophosphinsäurederivate, vorzugsweise D-Phe-[PO(OH)-CH<sub>2</sub>]-Phe-Phe und deren Salze als Inhibitoren der APP bevorzugt Apstatin, (2S,3R)-HAMH-L-Prolin, (2S,3R)-HAPB-L-Prolin, die entsprechen den L-Prolinmethylester, (2S,3R)-HAMH-/(2S,3R)-HAPB-pyrrolidide, -thiazolidide (HAMH = 3-Amino-2-hydroxy-5-methyl-hexanoyl, HAPB = 3-Amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl) und deren Salze als Inhibitoren des ACE bevorzugt Captopril, Enalapril, Lisinopril, Cilazopril und deren Salze als Inhibitoren der POP (PEP) bevorzugt Postatin, Eurystatin A oder B, N<sup>3</sup>-geschützte Peptidaldehyde, vorzugsweise Benzyloxycarbonyl-L-Prolyl-L-Prolinal bzw. Benzyloxycarbonyl-L-Thioprol-L-Thioprolinal, N<sup>3</sup>-ge-

45

50

55

60

65

geschützte Aminosäure(Xaa)-pyrrolidide bzw. -thiazolidide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure, bevorzugt L-Alanin, L-Valin, L-Isoleucin) sowie die entsprechenden 2-Cyanopyrrolidid- bzw. 2-Cyanothiazolididderivate, substratanaloge N<sup>3</sup>-geschützte Peptidphosphonsäurediarylester bzw. Peptiddiazo-methylketone bzw. Peptidammoniummethylketone und deren Salze

5 fungieren.

5. Verwendung von Inhibitor kombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Vorbeugung und Therapie von Autoimmunerkrankungen, vorzugsweise Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses, Multiple Sklerose, IDDM, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, Psoriasis, Neurodermitis, Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis, Vaskulitis, autoimmune Schilddrüsenerkrankungen oder autoimmunhämolytische Anämie, sowie anderen chronischen Erkrankungen mit entzündlicher Genese wie Allergien und Arteriosklerose.

10 6. Verwendung von Inhibitor kombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Unterdrückung von Transplantat-Abstoßung und zur Therapie von Tumorerkrankungen.

7. Pharmazeutische Zubereitungen, umfassend Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) oder DP IV-analoger Enzymaktivität in Kombination mit Inhibitoren eines der Enzyme Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzyme gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität), X-Pro-Aminopeptidase (Aminopeptidase P, APP), "angiotensin-converting enzyme" (ACE) und Prolyl oligopeptidase (POP, Prolyl endopeptidase, PEP) und in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Zusatz- und/oder Hilfsstoffen.

15 8. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 7, umfassend als Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure bzw. seitenkettengeschützte Derivate), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)<sub>n</sub>-Peptide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäuren, n = 0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine  $\alpha$ -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N<sup>4</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.

20 9. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 7, umfassend als Inhibitoren der DP IV vorzugsweise Aminosäureamide, z. B. N<sup>4</sup>-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid-, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat.

25 10. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 7 umfassend als Inhibitoren der APN, APP, ACE und POP (PEP), vorzugsweise Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Anastin, Probestin,  $\beta$ -Aminothiole,  $\alpha$ -Aminophosphonsäuren,  $\alpha$ -Aminophosphonsäurederivate, bevorzugt D-Phe-y[PO(OH)-CH<sub>2</sub>]-Phe-Phe und deren Salze als APN-Inhibitoren,

30 Apstatin, (2S,3R)-HAMH-L-Prolin, (2S,3R)-HAPB-L-Prolin, die entsprechenden L-Prolinmethylester, (2S,3R)-HAMH-/(2S,3R)-HAPB-pyrrolidide, -thiazolidide (HAMH = 3-Amino-2-hydroxy-5-methyl-hexanoyl, HAPB = 3-Amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl) und deren Salze als APP-Inhibitoren, Captopril, Enalapril, Lisinopril, Cilazopril und deren Salze als ACE-Inhibitoren,

35 Postatin, Eurystatin A oder B, N<sup>3</sup>-geschützte Peptid aldehyde, vorzugsweise Benzyloxycarbonyl-L-Prolyl-L-Prolin al bzw. Benzyloxycarbonyl-L-Thiopropyl-L-Thioprolinal, Na-geschützte Aminosäure(Xaa)-pyrrolidide bzw. -thiazolidide (Xaa =  $\alpha$ -Aminosäure, bevorzugt L-Alanin, L-Valin, L-Isoleucin) sowie die entsprechenden 2-Cyanopyrrolidid- bzw. 2-Cyanothiazolididderivate, substratanaloge N<sup>3</sup>-geschützte Peptidphosphonsäurediarylester bzw. Peptiddiazo-methylketone bzw. Peptidammoniummethylketone und deren Salze als POP (PEP)-Inhibitoren

40 fungieren.

11. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, umfassend zwei oder mehrere der Inhibitoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität, der APN bzw. APN-analoger Enzymaktivität, des ACE, der POP (PEP) und der XPNPEP2 in räumlich getrennter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zur gleichzeitigen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Verabreichung mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung.

45 12. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 7 bis 11 für die systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären, rektalen, vaginalen, sublingualen Applikation zusammen mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen.

50 13. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 7 bis 11 für die topische Anwendung in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln, einschließlich instillativer Applikation.

55

60

65

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☒ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**